



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/17, 15/85, 5/10, 1/21, C07K 14/62, 16/26, A61K 38/28, 39/395, G01N 33/563, 33/74	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/34653 (43) Date de publication internationale: 21 décembre 1995 (21.12.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00766 (22) Date de dépôt international: 12 juin 1995 (12.06.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/07191 13 juin 1994 (13.06.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY [FR/FR]; 34, rue Camille-Desmoulins, F-94800 Villejuif (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KOMAN, Ahmet [FR/FR]; 5, Grand-Rue, F-78240 Chambourcy (FR). CHASSIN, Dorine [FR/FR]; 126, boulevard de la Libération, F-94300 Vincennes (FR). BELLET, Dominique [FR/FR]; 18, rue Diderot, F-92170 Vanves (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: EPIL/PLACENTINE (54) Titre: EPIL/PLACENTINE (57) Abstract <p>The invention relates to a new protein called EPIL/placentine, and analogs thereof having an EPIL/placentine like activity obtained by deletion and/or substitution. The invention also relates to a DNA molecule coding for a polypeptide of the EPIL/placentine type. Finally, the invention relates to a pharmaceutical composition containing said protein or an analog.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet une nouvelle protéine dénommée EPIL/placentine, ses analogues présentant une activité de type EPIL/placentine, obtenus par délétion et/ou substitution. L'invention concerne également une molécule d'ADN codant pour un polypeptide de type EPIL/placentine. Elle concerne enfin une composition pharmaceutique contenant ladite protéine ou un analogue.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

EPIL/PLACENTINE

5 La présente invention concerne une nouvelle protéine dénommée placentine ou EPIL, ses analogues, leurs procédés de préparation ainsi que leurs applications.

 L'insuline, l'IGF-1, l'IGF-2 et la relaxine appartiennent à une famille d'hormones peptidiques ayant certaines structures et fonctions en
10 commun, notamment leur influence sur la prolifération, le développement, la différenciation et le métabolisme cellulaire.

 L'insuline est bien connue comme étant une hormone endocrine pancréatique régulant le métabolisme énergétique. Les facteurs de croissance de type insuline-IGF-1 sont des peptides promoteurs de
15 croissance impliqués dans la régulation endocrine, paracrine et autocrine de la croissance cellulaire et qui sont exprimés dans de nombreux tissus. L'IGF-2 a des propriétés similaires mais est exprimée en quantité plus importante en période prénatale et est considérée comme étant un facteur de croissance foetale.

20 La relaxine induit un remodelage des tissus conjonctifs dans le tractus reproductif et inhibe les contractions utérines. Son rôle fonctionnel dans le cerveau où une expression très importante a été obtenue reste à élucider.

 On a adjoint, récemment, à cette famille les Ley I-L qui sont
25 actuellement clonés sous forme d'ADNc et dont l'activité biologique est encore à définir. Cette famille peptidique présente en commun des caractères structuraux définis par la position de différentes cystéines essentielles pour la formation d'une structure tertiaire.

 L'insuline qui est le prototype de cette famille comprend deux
30 chaînes peptidiques A et B reliées par des ponts disulfure. Elle est codée par un ARNm qui est traduit en pre-pro insuline. Le peptide signal, de même que le peptide de jonction C, sont excisés par modification post-traductionnelle ; ceci est également valable pour la relaxine alors que les IGFs sont maturés différemment sans élimination du peptide C et demeurent
35 sous forme de chaîne unique. On a pu démontrer que tous les membres de cette famille se fixaient à des récepteurs de surface cellulaires. Ces

récepteurs ont été identifiés par clonage moléculaire et caractérisés en détail pour l'insuline et l'IGF. Ils appartiennent à la super-famille des récepteurs tyrosine-kinases (RTK's) qui comprend des récepteurs de facteurs de croissance et leurs analogues oncogènes tels que c-erbB2/neu (récepteur EGF), c-met (récepteur du facteur de croissance des hépatocytes), fms (récepteur de CSF-1) et trk (récepteur de NGF).

La voie de transduction du signal intracellulaire pour ces récepteurs est caractérisée par une activité tyrosine-kinase qui produit une autophosphorylation des résidus tyrosine sur le récepteur suivie par une chaîne d'événements correspondant à des phosphorylations. Ceci inclut notamment l'activation de l'IRS-1 (en particulier pour l'insuline et l'IGF), PI3K, Shc, GBR2, Sos, Ras, Raf et la protéine activant la mitogénèse (MAP) kinase notamment lorsque la cascade de phosphorylation affecte différents processus cellulaires tels que la transcription.

Les effets physiologiques pléiotropiques de cette cascade de signaux en général font l'objet de recherches intensives.

La présente invention concerne plus particulièrement une nouvelle molécule de cette famille de l'insuline qui est dénommée ci-après placentine ou EPIL (Early Placenta Insulin Like peptide) et dont la séquence d'acides aminés et celle de l'ADN qui code pour cette protéine correspond à la séquence ID 1.

La placentine ou EPIL a été isolée à partir d'une banque d'ADNc de cellules cytotrophoblastiques préparées à partir de placenta prélevé lors du premier trimestre de la grossesse. L'analyse par Northern blot (effectuée sur un très grand échantillonnage de tissus normaux) a révélé des niveaux d'ARN détectables seulement dans le tissu placentaire.

La séquence d'acides aminés qui a été obtenue montre, pour la protéine selon l'invention, un arrangement de résidus cystéine caractéristique de la famille de l'insuline.

Le traitement de cellules cibles avec des milieux conditionnés à partir de cellules cultivées exprimant la protéine recombinante paraît induire un schéma de phosphorylation de la tyrosine similaire à celui observé après traitement avec l'insuline.

Enfin, des expériences préliminaires suggèrent que l'EPIL/placentine induit la synthèse d'ADN.

C'est pourquoi la présente invention concerne plus particulièrement une protéine dénommée EPIL/placentine, protéine de formule correspondant à la séquence ID 1, représentée également figure 1, et ses analogues, présentant une activité de type EPIL/placentine et obtenue par délétion et/ou substitution.

Sur la séquence ID 1, la structure de l'EPIL/placentine correspond à la structure en acides aminés suivant la méthionine en position 36 jusqu'à l'acide aminé en position 174.

Les références aux séquences d'ADN de l'EPIL/placentine correspondent à cette séquence.

Les séquences nucléiques présentes avant le premier ATG présumé (souligné) et après le codon stop sont en minuscule.

Les analogues de l'EPIL/placentine sont les protéines ou peptides qui présentent une forte homologie, en particulier plus de 60 % d'homologie, de préférence 80 %, en acides aminés avec le composé correspondant à la séquence ID 1 et qui ont pu être obtenus par délétion ou par substitution tout en conservant les caractéristiques essentielles de l'EPIL/placentine. Ces analogues seront parfois nommés "composés de type EPIL/placentine".

En particulier, la présente invention concerne des fragments qui présentent certains des épitopes caractéristiques de l'activité de l'EPIL/placentine, notamment les protéines de type EPIL/placentine qui présentent au moins les 20 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la séquence ID 1.

La présente invention concerne bien entendu l'EPIL/placentine ou ses analogues sous forme glycosylée ou non glycosylée et les protéines présentant ou non les ponts disulfures de la protéine d'origine. En effet, cette protéine peut être préparée par extraction à partir d'échantillons biologiques mais sera de préférence obtenue par des techniques mettant en oeuvre le génie génétique et dont les structures secondaires pourront varier en fonction de l'organisme hôte.

L'invention concerne également une molécule choisie parmi :

- (a) la séquence d'ADN de la séquence ID 1,
- (b) les séquences d'ADN susceptibles de s'hybrider à la séquence précédente et qui codent pour un polypeptide de type EPIL/placentine, et

- (c) les séquences d'ADN qui compte tenu du code génétique correspondent aux séquences (a) ou (b) et qui codent pour un polypeptide de type EPIL/placentine.

En particulier, l'invention concerne la séquence d'ADN
5 correspondant à la séquence ID 1.

Bien entendu, les séquences d'ADN mentionnées précédemment peuvent être des séquences génomiques ou de type génomique, c'est-à-dire que certains des éléments peuvent être séparés par des introns qui seront excisés pour conduire à l'expression de
10 l'EPIL/placentine mature.

Les séquences d'ADN précédentes pourront être incorporées dans des vecteurs de clonage ou d'expression de l'EPIL/placentine ou de ses analogues, de préférence sous le contrôle d'éléments assurant leur expression dans une cellule hôte définie.

15 Les systèmes d'expression dans les cellules procaryotes ou eucaryotes sont bien connus de l'homme de métier, il pourra s'agir notamment de systèmes de type plasmidique ou de type viral comportant des promoteurs assurant l'expression dans la cellule hôte et munis également des éléments terminateurs nécessaires.

20 Mais il pourra également s'agir de vecteurs d'intégration qui pourront comporter leur propre système d'expression ou bien être conçus pour s'intégrer dans les chromosomes à des endroits où ils se trouveront sous la promotion d'un promoteur chromosomique, notamment dans le cas des cellules procaryotes, en utilisant la technique des recombinaisons
25 homologues.

La présente invention concerne également des cellules hôtes caractérisées en ce qu'elles comportent un vecteur autorépliquatif exprimant l'EPIL/placentine ou un analogue de l'EPIL/placentine selon l'invention ou une séquence d'ADN selon l'invention incorporé dans un chromosome et
30 exprimant l'EPIL/placentine ou un analogue de l'EPIL/placentine.

Comme cela a été indiqué précédemment, il pourra s'agir de cellules eucaryotes, en particulier de cellules de mammifères type cellule CHO, ou de cellules en culture d'autres types plus appropriées à la préparation de l'EPIL/placentine sous sa forme mature ; mais il est
35 également possible d'envisager l'utilisation de cellules bactériennes par exemple : dans ce cas il pourra être utile de faire subir des remaniements complémentaires à la protéine ainsi obtenue.

Il s'agit là encore de techniques qui sont connues de l'homme de métier et qui ne seront pas décrites plus complètement, sauf dans le cadre de certains des exemples ci-après.

5 Les cellules ainsi transformées par un vecteur autorépliatif exprimant la protéine ou ayant intégré la séquence exprimant la protéine dans ses chromosomes pourront être utilisées par culture dans un procédé permettant de préparer l'EPIL/placentine ou ses analogues.

10 Il s'agira notamment d'un procédé de préparation de l'EPIL/placentine ou ses analogues caractérisé par la mise en culture de cellules dont on extraira directement ou à partir du milieu de culture l'EPIL/placentine ou ses analogues.

L'EPIL/placentine pourra notamment être extraite par immuno-purification.

15 La présente invention concerne également les produits de recombinaison obtenus par le procédé mis en oeuvre précédemment.

Dans certains cas, la protéine pourra être préparée sous forme fusionnée, en particulier lorsqu'il s'agira d'un analogue de l'EPIL/placentine de type peptidique, ou bien lorsque la fusion avec cette protéine permettra d'atteindre plus facilement le site d'action de
20 l'EPIL/placentine ou de ses analogues, ou lorsque, dans certains cas, cette protéine permettra de leurrer certains systèmes naturels en assurant une plus longue durée de vie de la protéine en cause.

25 La présente invention concerne enfin des compositions pharmaceutiques utilisant l'EPIL/placentine ou ses analogues à titre de principe actif.

Comme cela a été indiqué, l'EPIL/placentine peut présenter un grand nombre d'activités, en particulier elle peut présenter comme d'autres facteurs humains de croissance de type 1 une activité au niveau cardiaque, notamment dans le traitement et la prévention de certains troubles
30 cardiaques tels que les insuffisances cardiaques aiguës.

Cette protéine ou certains de ses analogues peuvent présenter une activité de type facteur de croissance et promoteur de la lactation. Egalement, les produits peuvent être utilisés dans le processus de régénération de tissus nerveux, musculaire, cutané ou osseux, notamment
35 en cas de pathologies dégénératives ou endocriniennes, de lésions traumatiques ou d'affections virales.

Enfin, l'EPIL/placentine ou ses analogues peuvent présenter une action au niveau du contrôle de l'ensemble des phénomènes de la conception chez l'homme ou chez les animaux.

5 La présente invention concerne également des anticorps et plus spécialement des anticorps monoclonaux spécifiques de cette protéine ou de ses analogues ainsi qu'une méthode de diagnostic in vitro permettant, à l'aide de l'EPIL/placentine ou de ses analogues et/ou des anticorps correspondants, de détecter des taux anormaux d'EPIL/placentine dans les échantillons physiologiques ou non.

10 Des fragments d'ADN correspondant aux séquences mentionnées précédemment pourront être intégrés dans une stratégie thérapeutique "sens" ou "anti-sens" ; quant à l'EPIL/placentine ou ses analogues, ils pourront également être intégrés dans une stratégie de ciblage de certaines molécules pharmaceutiquement actives vers les
15 récepteurs de l'EPIL/placentine ou ses analogues.

La structure détaillée de l'EPIL/placentine correspond à la figure 2, c'est-à-dire un peptide signal position -17 à -1, une chaîne B 1 à 41, un peptide de connexion C de 42 à 92 puis une chaîne A de 93 à 122.

20 Cette structure apparente l'EPIL/placentine à la pro-insuline ou à la prorelaxine.

En particulier, la position des ponts disulfures doit conduire à une structure tridimensionnelle du type de l'insuline.

25 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après qui sera effectuée en se référant aux séquences ID 1 et figure 2 correspondant à la séquence de l'EPIL/placentine et du gène humain codant pour cette protéine.

EXEMPLES

30 La mise en évidence de l'EPIL/placentine est le fruit d'une recherche spécifique tendant à mettre en évidence les molécules impliquées dans la croissance cellulaire et/ou dans les processus néoplasiques.

Bien que le placenta soit un tissu normal, les cellules constitutantes présentent de nombreuses propriétés communes avec les cellules néoplasiques, notamment les cytotrophoblastes invasifs et

hautement mitotiques qui peuvent pénétrer le tissu maternel. Ces trophoblastes sont une source de facteurs de croissance, d'hormones et de récepteurs de facteurs de croissance notamment.

5 Les études actuelles montrent que les gènes préférentiellement exprimés dans les cellules trophoblastiques peuvent aussi être exprimés préférentiellement dans les cellules néoplasiques.

Mais tenant compte du fait que le placenta, et notamment les trophoblastes, demeurent sous un contrôle complet durant la grossesse normale, les molécules trophoblastiques correspondant à ce contrôle sont
10 des candidats très intéressants à titre d'agent anticancéreux ou susceptibles de contrôler le processus de cancérisation.

C'est pourquoi la méthode d'isolement qui a été utilisée est une méthode de soustraction de ADNc mettant en oeuvre la technologie PCR sur des trophoblastes jeunes. Ceci a permis de mettre en évidence des gènes qui
15 sont surexprimés dans ces cellules et qui pourraient avoir un rôle dans la croissance cellulaire et dans la régulation de cette croissance.

MATERIEL ET METHODES

Tissus

Des placentas de 5 à 12 semaines et des placentas à terme, de même que des échantillons chirurgicaux de tissus normaux et tumoraux, ont
20 été réfrigérés immédiatement (dans les 10 minutes suivant l'intervention chirurgicale) et conservés dans l'azote liquide jusqu'à la préparation des ARN. Ces collections de tissus ont été obtenues et utilisées en accord avec les protocoles approuvés par les Comités des différents hôpitaux.

Cellules

Les lignées de cellules humaines utilisées pendant cette étude et leurs origines histologiques sont les suivantes : choriocarcinome gestationnel (JAR et JEG-3) ; carcinome hépatocellulaire (PLC/PRF/5 et Hep G2) ; adénocarcinome du colon (LS180) ; carcinome de l'ovaire (OV1/p, OV1VCR), la lignée de cellules OV1/VCR est dérivée de OV1/p et est résistante
30 à la vincristine ; carcinome épidermoïde (A431) ; carcinome du poumon (A427) ; carcinome épithéloïde du cervix (HeLa) ; carcinome mammaire (MCF7, MDA-MB-361, SK-BR-3, BT-20 et BT-474) ; cellules mammaires transformées par SV-40 (HBL-100) ; lignée cellulaire de neuroblastome
35 (SHSY-5Y) ; lignée cellulaire de fibroblaste normal (CCL-137).

Toutes ces lignées cellulaires étant disponibles à l'ATCC à l'exception de l'IGR/OV1 (OV1/p) et d'OV1/VCR.

Ces lignées cellulaires sont mises en croissance dans un milieu DMEM ou RPMI-1460 (Gibco-BRL Laboratoires, Gaithersburg, MA) 5 supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur, 10 μ M d'acides aminés non essentiels, 4 mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine à 37°C avec 5 % de CO₂.

Isolement des cytotrophoblastes

Les cytotrophoblastes sont purifiés comme cela est décrit par 10 Kliman et al. Endocrinology, 118: 1567-1582, 1986. En bref, les tissus villeux du placenta du premier trimestre sont dispersés avec de la trypsine et de la déoxyribonucléase I. Les cellules dispersées sont alors purifiées sur un gradient Percoll 5-70 % (Pharmacia). La bande à 1 040-1 060 g/ml de densité est collectée. L'examen microscopique révèle qu'elle comprend des cellules 15 cytotrophoblastiques avec moins de 5 % de contamination par des cellules non trophoblastiques telles que les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales.

Préparation de l'ARN

L'ARN total est préparé à partir de cultures de cellules 20 préconfluentes ou de tissus réfrigérés en utilisant de l'isothiocyanate de guanidine et par ultracentrifugation sur un gradient de chlorure de césium en adaptant le protocole de Chirgwin et al. Les ARN des polysomes associés aux membranes du reticulum endoplasmique (MB-ARN) sont purifiés comme cela a été décrit précédemment. Après trypsination et 25 purification sur gradient de Percoll, les cellules cytotrophoblastiques sont homogénéisées, puis les MB-ARN sont isolés sur gradient de sucrose en incluant un complexe ribonucléoside vanadyl comme inhibiteur de ribonucléase.

Synthèse des ADNc et amplification par PCR

30 0,1 μ g de MB-ARN est dissous dans 5 μ l d'eau traitée DEPC et dénaturé avec 0,1 M MeHgOH et β -mercaptoéthanol. Le premier brin d'ADNc est synthétisé avec la transcriptase réverse du virus de la myoblastose aviaire (trousse Invitrogen, San Diego) en utilisant le primer-dT modifié indiqué ci-après (Frohman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8998-9002, 35 1988). Les hétéroduplex ARN-ADNc de taille comprise entre 0,5 et 2 kb sont

électroélués après migration dans un gel d'agarose à 2 %. Une queue d'oligo dG est ajoutée à l'extrémité 3' du premier brin d'ADNc avec la transférase déoxynucléotide terminale et l'ARN est éliminé par hydrolyse alcaline. Les ADNc sont amplifiés avec des amorces non spécifiques incluant les sites de restriction pour les enzymes NotI et Sall.

La séquence de l'amorce T utilisée pour la transcription réverse et la PCR est la suivante :

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'

L'amorce C est identique à celle décrite dans Loh et al.,

(Science, 243 : 217-220, 1989) :

5'-GCATCGGCGCGGCGGAGGCCCCCCCCCCCCCG-3'

Le mélange réactionnel comporte 1,25 mM de chacun des 4 désoxyribonucléotides triphosphates, 0,5 μ M de chaque amorce et 2,5 unités de Taq polymérase dans 50 mM KCl - 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) - 3,5 mM $MgCl_2$ -

0,01 % gélatine. L'amplification est effectuée dans un thermocycleur pour 25 cycles de 20 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C. Les produits sont chargés sur un gel d'agarose à 1 % à fusion basse. Puis la région 0,5-2 kb est excisée et réamplifiée dans les mêmes conditions. Les produits sont précipités, digérés totalement avec NotI et Sall, les tailles sont sélectionnées comme précédemment et électroéluées à partir d'agarose, précipitées et quantifiées.

L'ADNc total de placenta à terme et de lymphocytes T activés par de la phytohémataglutinine et cultivés pendant plusieurs jours en présence d'IL2 a été préparé en utilisant un système de synthèse d'ADNc double brin.

Construction de la banque soustraite d'ADNc

L'hybridation soustractive est effectuée comme cela est décrit par Klickstein (Klickstein et al. Current protocols in molecular biology, pp 5.8.9.-5.8.15 Wiley Interscience, 1989). 0,2 μ g d'ADNc de cellules cytotrophoblastiques amplifiés par PCR sont mis à digérer avec NotI et Sall, mélangés avec 8 μ g d'ADNc de lymphocytes T activés et 8 μ g d'ADNc de placenta à terme digérés avec AluI et RsaI, dissous dans 40 μ l de tampon d'hybridation (50 % de formamide déionisé ; 10 mM de tampon phosphate sodium, pH 7 ; 5 X SSC ; 0,1 % SDS ; 10 mM EDTA), dénaturés 5 minutes à 98°C et incubés 24 heures à 37°C.

Les séquences communes entre cible et compétiteur sont reprises pour former des duplex entre les fragments courts (Alu/Rsa, compétiteur) et longs (Not/Sal de la cible), en inhibant la formation d'extrémités cohésives. Les brins d'ADNc complémentaires exprimés spécifiquement dans les cytotrophoblastes jeunes permettent la régénération des extrémités cohésives NotI et Sall pour un clonage unidirectionnel dans les sites pBSKII + phagemid de vecteur (Stratagene).

Criblage de la banque

La banque d'ADNc soustraite est étalée sur milieu de culture gélosé et les colonies recombinantes sont prélevées et mises en culture dans le milieu LB puis amplifiées par PCR. Les ADN plasmidiques préparés par la méthode des minipréparations bouillies (Del Sal G. et al. Nucleic Acids Res., 16: 9878, 1988) et digérés avec NotI et Sall ou les produits des inserts amplifiés par PCR à l'aide des amorces originales sont analysés par Southern blot sur des gels à 1,2 % d'agarose. La taille moyenne des inserts est entre 500 et 1 000 nucléotides. Les gels sont transférés en double sur membranes de nylon (Hybond N, Amersham) dans un tampon alcalin. Les sondes utilisées pour l'hybridation sont des ADNc totaux synthétisés à partir des placentas jeunes, des placentas à terme et des lymphocytes T activés marqués au ^{32}P (Amersham) par multi-amorçage aléatoire. L'hybridation se déroule pendant 18 heures à 42°C suivie par un lavage stringant dans 0,1 X SSC à 50°C et la mise en autoradiographie.

Analyse sur Northern blot

5 µg d'ARN total provenant de différents tissus et de lignées cellulaires sont analysés sur un gel à 1 % d'agarose contenant 2,2 M de formaldéhyde. Quand l'électrophorèse est terminée, le gel est rincé avec de l'eau bi-distillée et traité avec 10 x SSC pendant 30 minutes. L'ARN est alors transféré sur membrane de nitrocellulose renforcée (Schleicher et Schuell, Dassel) dans le tampon de transfert 20 X SSC pendant 18 heures. Les ARN transférés sont fixés sur les membranes par irradiation aux UV avant hybridation. Les sondes utilisées pour hybrider les membranes sont des inserts excisés marqués au ^{32}P par multi-amorçage aléatoire, ou des sondes monobrins générées par PCR en utilisant une amorce antisens universelle. L'hybridation est effectuée une nuit à 42°C suivie par des conditions de lavage stringentes dans 0,1 X SSC à 50°C et la mise en autoradiographie.

Séquencage de l'ADN et analyse

- Les ADN plasmidiques sont préparés par la méthode des minipréparations bouillies. Le séquençage de l'ADN est réalisé avec le kit Sequenase, version 2.0 (U.S. Biochemical). Les amorces sont soit des amorces universelles M13, T3, T7 ou des amorces spécifiques internes. Les produits de réaction sont analysés sur des gels contenant 6 % d'acrylamide et 50 % d'urée. Les séquences obtenues sont comparées aux séquences des différentes banques de données.

Analyse

- Les clones qui ne donnent pas de signal d'hybridation avec les sondes normalisées sont analysés par séquençage partiel et comparaison dans ces banques de données.

L'un des clones correspondant à l'EPIL/placentine correspond à la séquence en acides aminés correspondant à la séquence ID 1.

- Les échantillons d'ARN totaux et polyA préparés à partir de lignées cellulaires transformées ou normales et des tissus correspondants sont analysés par Northern blot à l'aide de sondes ADNc d'EPIL/placentine antisens monobrin marquées. Les signaux d'hybridation sont détectés seulement dans les placentas, en particulier en début de grossesse, et sont pratiquement inexistantes dans les autres tissus comme cela ressort du tableau ci-après (tableau I) :

TABEAU I

5	PLACENTA JEUNE	++++
	PLACENTA A TERME	++
	FOIE NORMAL	-
	FOIE TUMORAL	-
	VESSIE NORMALE	-
10	VESSIE TUMORALE	-
	EPIPLOON NORMAL	-
	EPIPLOON TUMORAL	-
	OESOPHAGE NORMAL	-
	OESOPHAGE TUMORAL	-
15	COLON NORMAL	-
	COLON TUMORAL	-
	ESTOMAC NORMAL	-
	COL DE L'UTERUS TUMORAL	-
	ENDOMETRE NORMAL	-
20	OVAIRE NORMAL	-
	SEIN TUMORAL	-
	GANGLION TUMORAL	-
	RATE NORMALE	-
	RECTUM NORMAL	-
25	RECTUM TUMORAL	-
	TROMPE DE FALLOPE NORMALE	-
	PEAU NORMALE	-
	MYOMETRE NORMAL	-
	GLANDE SURRENALE NORMALE	-
30	THYROIDE NORMALE	-
	THYROIDE TUMORALE	-

Des études effectuées sur des produits d'origine murine et simienne montrent des analogies indiquant des similitudes fonctionnelles significatives entre les espèces.

Expression de l'EPIL/placentine

5 Pour l'expression eucaryotique de l'EPIL/placentine, l'ADNc a été inséré dans le vecteur d'expression pBK-CMV dans l'orientation sens et antisens.

Deux types cellulaires ont été utilisés de façon à étudier les effets possibles des modifications post-traductionnelles inhérentes aux
10 types cellulaires. Des cellules de rein de singe COS-7 ont été transfectées par DEAE pour l'expression transitoire tandis que des cellules trophoblastiques humaines transformées par SV40 (3AsubE) ont été transfectées par CaPO4 pour l'expression transitoire et stable.

Les cellules COS-7 et 3AsubE n'expriment pas de niveaux
15 détectables d'ARNm d'EPIL/placentine en analyse par Northern blot. Les cellules transfectées sont conditionnées avec un milieu de culture exempt de sérum.

Les milieux conditionnés obtenus à partir des cellules transfectées sens ou antisens sont analysés pour tester la présence de
20 protéines recombinantes.

L'activité biologique de la protéine recombinante est analysée sur différentes cellules cibles, considérant que les récepteurs spécifiques peuvent exister ou que la protéine peut se fixer sur d'autres récepteurs pour des molécules de structure proche, comme cela a été observé pour l'insuline
25 et l'IGF.

Les résultats préliminaires observés suggèrent que l'EPIL/placentine induirait la tyrosine phosphorylation des protéines cellulaires et aurait une activité biologique sur la croissance des cellules trophoblastiques.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

- (i) DEPOSANT:
 (A) NOM: INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY
 (B) RUE: 39 RUE CAMILLE DESMOULINS
 (C) VILLE: VILLEJUIF
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 94800
- (ii) TITRE DE L' INVENTION: NOUVELLE PROTEINE DENOMMEE EPIL/PLACENTIN,
 PROCEDE DE PREPARATION DE CETTE PROTEINE ET COMPOSITION
 PHARMACEUTIQUE LA CONTENANT, ADN CODANT POUR LADITE
 PROTEINE
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1
- (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
 (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 618 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 107..523

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CAGTCTGGAG CCCAGAAGGG ACACACCAGC ACAGTCTGGT AGGCTACAGC AGCAAGTCTC	60
TAAAGAAAGG CTGAGAACAC CCAGAACAGG AGAGTTCAGG TCCAGG ATG GCC AGC	115
Met Ala Ser	
1	
CTG TTC CGG TCC TAT CTG CCA GCA ATC TGG CTG CTG CTG AGC CAA CTC	163
Leu Phe Arg Ser Tyr Leu Pro Ala Ile Trp Leu Leu Leu Ser Gln Leu	
5 10 15	
CTT AGA GAA AGC CTA GCA GCA GAG CTG AGG GGA TGT GGT CCC CGA TTT	211
Leu Arg Glu Ser Leu Ala Ala Glu Leu Arg Gly Cys Gly Pro Arg Phe	
20 25 30 35	
GGA AAA CAC TTG CTG TCA TAT TGC CCC ATG CCT GAG AAG ACA TTC ACC	259
Gly Lys His Leu Leu Ser Tyr Cys Pro Met Pro Glu Lys Thr Phe Thr	
40 45 50	

ACC ACC CCA GGA GGG TGG CTG CTG GAA TCT GGA CGT CCC AAA GAA ATG 307
Thr Thr Pro Gly Gly Trp Leu Leu Glu Ser Gly Arg Pro Lys Glu Met
55 60 65

GTG TCA ACC TCC AAC AAC AAA GAT GGA CAA GCC TTA GGT ACG ACA TCA 355
Val Ser Thr Ser Asn Asn Lys Asp Gly Gln Ala Leu Gly Thr Thr Ser
70 75 80

GAA TTC ATT CCT AAT TTG TCA CCA GAG CTG AAG AAA CCA CTG TCT GAA 403
Glu Phe Ile Pro Asn Leu Ser Pro Glu Leu Lys Lys Pro Leu Ser Glu
85 90 95

GGG CAG CCA TCA TTG AAG AAA ATA ATA CTT TCC CGC AAA AAG AGA AGT 451
Gly Gln Pro Ser Leu Lys Lys Ile Ile Leu Ser Arg Lys Lys Arg Ser
100 105 110 115

GGA CGT CAC AGA TTT GAT CCA TTC TGT TGT GAA GTA ATT TGT GAC GAT 499
Gly Arg His Arg Phe Asp Pro Phe Cys Cys Glu Val Ile Cys Asp Asp
120 125 130

GGA ACT TCA GTT AAA TTA TGT ACA TAGTAGAGTA ATCATGGACT GGACATCTCA 553
Gly Thr Ser Val Lys Leu Cys Thr
135

TCCATTCTCA TATGTATTCT CAATGACAAA TTCACTGATG CCCAATTAAA TGATTGCTGT 613

TTAAA 618

REVENDICATIONS

- 1) EPIL/placentine, protéine de formule correspondant à la séquence ID 1, et ses analogues présentant une activité de type EPIL/placentine, obtenus par délétion et/ou substitution.
- 5 2) EPIL/placentine selon la revendication 1, correspondant à la structure protéique de la séquence ID 1.
- 3) Protéine de type EPIL/placentine, caractérisée en ce qu'elle présente au moins les 20 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la séquence ID 1.
- 10 4) Analogue de l'EPIL/placentine, caractérisé en ce qu'il présente au moins 60 % d'homologie avec la structure de la séquence ID 1.
- 5) EPIL/placentine ou analogues d'EPIL/placentine, caractérisés en ce que la protéine est glycosylée.
- 6) Une molécule d'ADN choisie parmi :
- 15 (a) la séquence d'ADN correspondant à la séquence ID 1,
- (b) les séquences d'ADN susceptibles de s'hybrider à la séquence précédente et qui codent pour un polypeptide de type EPIL/placentine, et
- (c) les séquences d'ADN qui compte tenu du code génétique
- 20 correspondent aux séquences (a) et (b) et qui codent pour un polypeptide de type EPIL/placentine.
- 7) Une molécule d'ADN correspondant à la séquence ID 1.
- 8) Vecteur d'expression de l'EPIL/placentine ou de protéines de type EPIL/placentine, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence
- 25 d'ADN sous le contrôle d'éléments pouvant assurer son expression dans une cellule hôte.
- 9) Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle comporte un vecteur autorépliquatif exprimant l'EPIL/placentine ou un analogue d'EPIL/placentine selon l'une des revendications 1 à 5, ou une séquence
- 30 d'ADN selon l'une des revendications 6 et 7 incorporée dans son chromosome et exprimant l'EPIL/placentine ou un analogue d'EPIL/placentine.
- 10) Cellule selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule eucaryote.
- 35 11) Cellule selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie.

12) Procédé de préparation d'EPIL/placentine ou d'une protéine de type EPIL/placentine, caractérisé par la mise en culture de cellules dont on extraira directement ou à partir du milieu de culture l'EPIL/placentine ou ses analogues.

5 13) EPIL/placentine ou analogue de EPIL/placentine obtenus par le procédé selon la revendication 12.

14) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient une EPIL/placentine ou un analogue d'EPIL/placentine.

10 15) Anticorps monoclonaux dirigés contre l'EPIL/placentine ou un analogue d'EPIL/placentine selon l'une des revendications 1 à 5.

16) Méthode de diagnostic mettant en oeuvre l'EPIL/placentine ou un analogue de l'EPIL/placentine selon l'une des revendications 1 à 5 ou un anticorps monoclonal selon la revendication 15.

1/2

agt ctg gag ccc aga agg gac aca cca gca cag tct ggt agg cta cag cag caa gtc tct	60
Ser Leu Glu Pro Arg Arg Asp Thr Pro Ala Gln Ser Gly Arg Leu Gln Gln Gln Val Ser	
aaa gaa agg ctg aga aca ccc aga aca gga gag ttc agg tcc agg <u>ATG</u> GCC AGC CTG TTC	120
Lys Glu Arg Leu Arg Thr Pro Arg Thr Gly Glu Phe Arg Ser Arg Met Ala Ser Leu Phe	
CGG TCC TAT CTG CCA GCA ATC TGG CTG CTG CTG AGC CAA CTC CTT AGA GAA AGC CTA GCA	180
Arg Ser Tyr Leu Pro Ala Ile Trp Leu Leu Leu Ser Gln Leu Leu Arg Glu Ser Leu Ala	
GCA GAG CTG AGG GGA TGT GGT CCC CGA TTT GGA AAA CAC TTG CTG TCA TAT TGC CCC ATG	240
Ala Glu Leu Arg Gly Cys Gly Pro Arg Phe Gly Lys His Leu Leu Ser Tyr Cys Pro Met	
CCT GAG AAG ACA TTC ACC ACC ACC CCA GGA GGG TGG CTG CTG GAA TCT GGA CGT CCC AAA	300
Pro Glu Lys Thr Phe Thr Thr Thr Pro Gly Gly Trp Leu Leu Glu Ser Gly Arg Pro Lys	
GAA ATG GTG TCA ACC TCC AAG AAC AAA GAT GGA CAA GCC TTA GGT ACG ACA TCA GAA TTC	360
Glu Met Val Ser Thr Ser Asn Asn Lys Asp Gly Gln Ala Leu Gly Thr Thr Ser Glu Phe	
ATT CCT AAT TTG TCA CCA GAG CTG AAG AAA CCA CTG TCT GAA GGG CAG CCA TCA TTG AAG	420
Ile Pro Asn Leu Ser Pro Glu Leu Lys Lys Pro Leu Ser Glu Gly Gln Pro Ser Leu Lys	
AAA ATA ATA CTT TCC CGC AAA AAG AGA AGT GGA CGT CAC AGA TTT GAT CCA TTC TGT TGT	480
Lys Ile Ile Leu Ser Arg Lys Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Phe Asp Pro Phe Cys Cys	
GAA GTA ATT TGT GAC GAT GGA ACT TCA GTT AAA TTA TGT ACA tag tag agt aat cat gga	540
Glu Val Ile Cys Asp Asp Gly Thr Ser Val Lys Leu Cys Thr Xaa Xaa Ser Asn His Gly	
ctg gac atc tca tcc att ctc ata tgt att ctc aat gac aaa ttc act gat gcc caa tta	600
Leu Asp Ile Ser Ser Ile Leu Ile Cys Ile Leu Asn Asp Lys Phe Thr Asp Ala Gln Leu	
aat gat tgc tgt tta	615
Asn Asp Cys Cys Leu	

FIGURE 1

2 / 2

[illegible]

FIGURE 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int lional Application No
 PCT/FR 95/00766

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/17 C12N15/85 C12N5/10 C12N1/21 C07K14/62
 C07K16/26 A61K38/28 A61K39/395 G01N33/563 G01N33/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Week 7338 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 56444u & JP,B,48 030 370 (SANSEI SEIYAKU CO LTD) see abstract ---	1, 12, 13
A	DATABASE WPI Week 7119 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 32716s & SU,A,273 369 (LITVINOV VV) see abstract --- -/--	1, 12, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 September 1995

Date of mailing of the international search report

03.11.1995

 Name and mailing address of the ISA
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No

PCT/FR 95/00766

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE BIOSIS BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US AN 70:132499, LITVINOV V.V 'Active preparation from human placental tissue' see abstract & VRACH DELO, vol. 5, 1969 pages 120-122, LITVINOV VV ---	1,2, 13-15
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 78, no. 22, 4 June 1973 Columbus, Ohio, US; abstract no. 140430a, ALTUNYAN ET AL. 'Amino acid composition of a new blood substituted from the placenta, aminoplacentin' page 281; column 140435; see abstract & BIOL. ZH. ARM., vol. 8, 1972 pages 99-100, ALTUYAN ET AL. -----	1,3,13, 14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No

PCT/FR 95/00766

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE			
CIB 6	C12N15/17 C07K16/26	C12N15/85 A61K38/28	C12N5/10 A61K39/395
			C12N1/21 G01N33/563
			C07K14/62 G01N33/74
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE			
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)			
CIB 6 C07K			
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche			
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)			
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents		no. des revendications visées
A	<p>DATABASE WPI Week 7338 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 56444u & JP,B,48 030 370 (SANSEI SEIYAKU CO LTD) voir abrégé</p>		1, 12, 13
A	<p>DATABASE WPI Week 7119 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 32716s & SU,A,273 369 (LITVINOV VV) voir abrégé</p>		1, 12, 13
-/-			
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "a" document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
20 Septembre 1995		03. 11. 95	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Gac, G	

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No

PCT/FR 95/00766

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US AN 70:132499, LITVINOV V.V 'Active preparation from human placental tissue' voir abrégé & VRACH DELO, vol. 5, 1969 pages 120-122, LITVINOV VV</p> <p>---</p>	<p>1,2, 13-15</p>
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 78, no. 22, 4 Juin 1973 Columbus, Ohio, US; abstract no. 140430a, ALTUNYAN ET AL. 'Amino acid composition of a new blood substituted from the placenta, aminoplacentin' page 281; colonne 140435; voir abrégé & BIOL. ZH. ARM., vol. 8, 1972 pages 99-100, ALTUYAN ET AL.</p> <p>-----</p>	<p>1,3,13, 14</p>